

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 1 0 日現在

機関番号： 1 4 3 0 1

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2013 ~ 2014

課題番号： 2 5 8 9 3 1 0 7

研究課題名 (和文) Exocyst Complexによる遊離脂肪酸取り込み制御

研究課題名 (英文) The regulation of fatty acid uptake by Exocyst Complex

研究代表者

井上 真由美 (INOUE, MAYUMI)

京都大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・助教

研究者番号： 8 0 5 1 2 0 7 9

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : Exocyst complexはインスリン刺激による脂肪細胞へのブドウ糖取り込みに重要な役割を有する。今回、私たちはexocyst complexの脂肪細胞における脂肪酸の取り込みに対する影響を検討した。脂肪細胞はインスリン依存性に細胞外の脂肪酸を細胞内に取り込む。脂肪細胞による脂肪酸取り込みはAktのリン酸化、および細胞骨格に依存する。また、exocyst complexの構成タンパクであるExo70およびSec8のノックダウンをすると、取り込みは有意に抑制された。これらの結果はexocyst complexの脂肪細胞における脂肪酸取り込みにおける役割をあらたに示唆する。

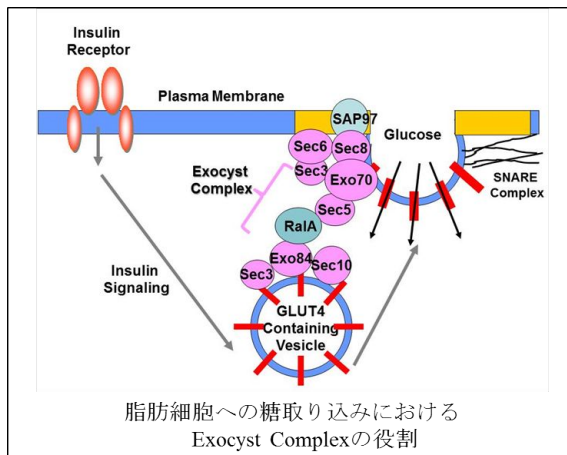
研究成果の概要 (英文) : We have already reported that the exocyst complex drives vesicle trafficking in adipocytes, a critical step in insulin stimulated glucose uptake (Inoue et al., Nature). In this study, we assessed the role of the exocyst complex in regulation of free fatty acid (FFA) uptake by adipocytes. Adipocytes incorporate extracellular FFAs in an insulin-dependent manner. A kinetic assay using fluoresceinated FFA (C12 dodecanoic acid) uptake allows the real-time monitoring of FFA internalization by adipocytes. The insulin-dependent uptake of C12 dodecanoic acid by adipocytes is mediated by Akt phosphorylation and microtubules. Knocking down of the exocyst components Exo70 and Sec8 significantly reduced insulin-dependent FFA uptake by adipocytes. These results demonstrate a novel role played by the exocyst complex in the regulation of FFA uptake by adipocytes.

研究分野： 代謝

キーワード： 脂肪酸 脂肪細胞 肥満 インスリン

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景



代謝疾患や循環器、悪性疾患にいたるさまざまな疾患の原因の一つである可能性が示唆され、先進国におけるライフスタイルの変遷ゆえに避けがたい問題となった肥満。そのメカニズムの解明および治療法の開発は人類の健康に大きく寄与する。

Exocyst Complex は Sec3、Sec5、Sec6、Sec8、Sec10、Sec15、Exo70、Exo84 という 8 つの蛋白質の集合体である。従来酵母の出芽や分泌顆粒の分泌機構に関係すること、哺乳類では神経末端の分泌顆粒の動きに関連することが知られているのみだったが、私たちは、Exocyst Complex が哺乳類の脂肪細胞において、糖の取り込みに重要な役割を果たすことを世界に先駆けて発見した (Inoue M et al., *Nature* 2003)。通常、脂肪細胞内にある“糖輸送体 (GLUT4) を含む小胞” (GLUT4 containing vesicle : GCV) は、インスリン刺激により、細胞膜に接着癒合し GLUT4 を細胞膜外へ表出させて細胞外の糖を脂肪細胞内に取り込む。Exocyst Complex はその最後の過程で、重要な役割を演ずるのである。さらに、その Exocyst Complex が細胞膜表面の中でも

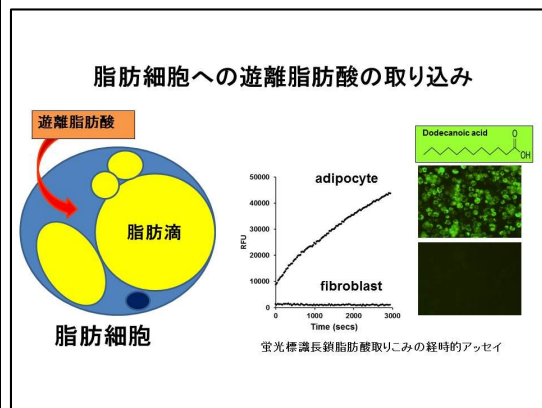
一部の限られた領域である Lipid Raft と呼ばれる領域に存在すること、さらに細胞膜蛋白である SAP97 と結合してその役割を調節していることなどを発見した (Inoue et al., *Mol Biol Cell* 2006)。

2. 研究の目的

脂肪細胞の膜表面にある Lipid Raft で展開されるダイナミクスの中で、脂肪細胞の代謝に最も重要な物質は糖以外に脂肪酸がある。取り込まれた脂肪酸は脂肪細胞の中で lipid droplet となって、脂肪細胞の大きさに直接影響を与える。また、その脂肪細胞の大きさはすなわち固体の肥満に直結し、脂肪細胞自身のインスリンに対する反応性と深い関係を持つことが知られている。

私たちはこの Exocyst Complex の糖取り込みのみならず、脂肪酸の取り込みにおける意義を明らかにするために本研究を行った。

3. 研究の方法

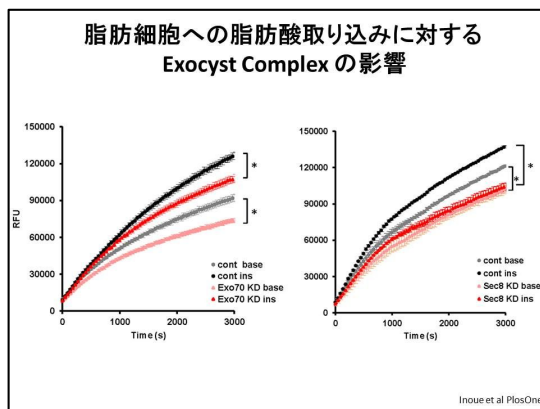


脂肪細胞における糖取り込みに比較して、脂肪酸取り込みはまだそのメカニズムが明らかになっていない部分が多いが、私たちは蛍光ラベルされた長鎖脂肪酸 (C12 dodecanoic acid) を用いて脂肪細胞への取り込みをリアルタイムで経時的に測定する系を独自に確

立した。上図のように、培養液中に存在する蛍光ラベルされた脂肪酸はインスリン刺激により時間依存性に脂肪細胞の中に取り込まれて行く。この蛍光強度を経時的に、定量的に測定することにより、私たちは、Exocyst Complex が脂肪酸取り込みに関わる役割、およびそのシグナリングを解析した。

4. 研究成果

(1) Exocyst Complex の脂肪細胞における遊離脂肪酸取り込みにおける役割



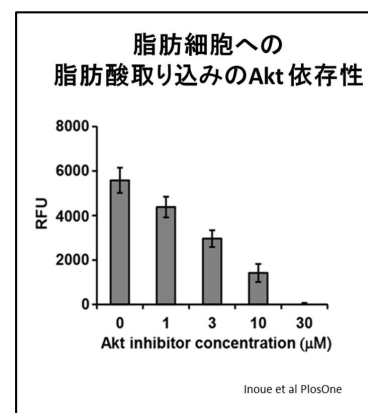
脂肪細胞において Exocyst Complex の構成タンパクである Exo70、Sec8 などをノックダウンするとインスリン刺激下の遊離脂肪酸取り込みが有意に抑制された（上図）。

脂肪細胞の細胞膜表面に存在する脂肪酸受容体、及び関連タンパクはいくつか明らかになっている。FATP (Fatty acid transport protein)、FABP (Fatty acid binding protein)、CD36 (Fatty acid translocase)、そして Caveolin-1 である。これらのうち、FATP、FABP、CD36 の遺伝子を RNAi を用いてそれぞれノックダウンし、脂肪酸の取り込みを測定した。しかし、驚くことに脂肪細胞における遊離脂肪酸の取り込みに有意な変化は見られなかった。私はこれまで脂肪細胞膜表面の Lipid Raft に存在する Exocyst Complex がブドウ糖の取り込みに

重要であることを報告してきたが（Inoue et al., *Mol Biol Cell* 2006）。上記の脂肪酸受容体の中でも Caveolin-1 は Lipid Raft に限局的に発現し、そのマーカーともなるタンパクである。ゆえに、Caveolin-1 による脂肪酸の取り込みを Exocyst Complex が調節している可能性は非常に高いため、現在 Caveolin-1 の脂肪酸取り込みに対する影響を検討中である。

また、これらの遺伝子のダブルノックダウンをした脂肪細胞での遊離脂肪酸の取り込みも検討している。

(2) Exocyst Complex による脂肪酸の取り込みを調節するシグナルの解明



脂肪細胞へのブドウ糖の取り込みのメカニズムにおけるインスリンシグナルのカスケードについては詳しく研究されているが、脂肪酸の取り込みに関するシグナルのカスケードの細部にいたってはまだ明らかになっていないことが多い。私達は、さまざまなシグナル阻害薬を用いて私達の確立した脂肪酸取り込みアッセイを行った。

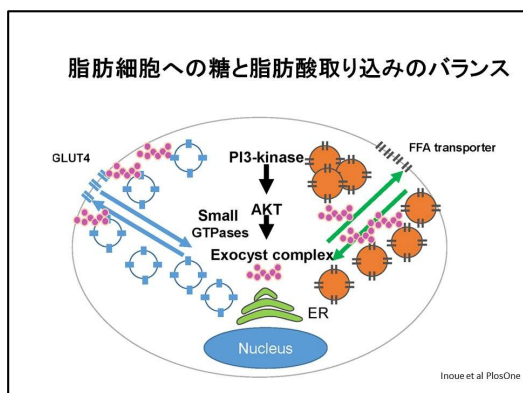
興味深いことに、この脂肪酸の取り込みはAktリン酸化阻害薬で特異的に抑制された（上図）。

興味深いことに、Exocyst Complex はAktの直接の基質である TANK-binding kinase 1(TBK1)

と結合し Akt のリン酸化を調節していることが報告されている (Ou YH et al., *Mol Cell* 2011)。

Exocyst Complex によるこれらのカスケード調節機構が脂肪細胞における脂肪酸の取り込みにどのように関わるかを、さまざまな他の阻害薬や RNAi を用いて検討中である。

また、Exocyst Complex は細胞骨格に沿って分泌顆粒が細胞質から細胞膜表面へ移動する部位に作用するということが報告されているため、この microtubule を破壊する nocodazole を用いて脂肪細胞における遊離脂肪酸取り込みに影響を検討したところ、Nocodazole の用量依存性に脂肪酸取り込みが抑制されることを発見した。現在、この現象における Exocyst Complex の働きとの関係を検討中である。



このように脂肪細胞において、同じタンパク群が、一方ではブドウ糖取り込みに関与し、また一方では脂肪酸取り込みに関与することが明らかになった。脂肪細胞における脂肪含有量すなわち Lipid droplet の大きさは、脂肪細胞そのものの大きさを規定し、固体の肥満に直接関与する。また、脂肪細胞の大きさは、その細胞自身のインスリンに対する反応性に深くかわることが知られている。これらのことから、脂肪細胞において、ブドウ糖のとりこみ、脂肪酸のとりこみのメカニズム

を介して、肥満とインスリン感受性のバランスにこの Exocyst Complex は関与している可能性がある。この仮説を元に、現在さらに研究を進めている。

5 . 主な発表等

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 井上真由美、赤間剛、Yibin Jiang、全泰和
脂肪細胞の遊離脂肪酸とりこみにおける Exocyst Complex の意義について
第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会
2016.5.19-21 (京都)

(2) 井上真由美、赤間剛、Yibin Jiang、全泰和
Exocyst Complex による脂肪細胞への脂肪酸取り込み
第 88 回 日本内分泌学会学術総会
2015.4.23-25 (東京)

(3) Inoue M, Jiang Y, Chun TH.
“The Exocyst Complex Regulates Akt-Dependent Long Chain Fatty Acid Uptake of Adipocytes”
16th International Congress of Endocrinology
/ The 96th Annual Meeting of The Endocrine Society
Chicago, Illinois, USA, June 2014

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井上真由美 (INOUE, Mayumi)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80512079